

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004年6月10日 (10.06.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/047868 A1

(51) 国際特許分類7: A61K 45/00,
38/00, 31/165, 31/122, A61P 27/06, 43/00

[JP/JP]: 〒630-0101 奈良県 生駒市 高山町8916-16 参
天製薬株式会社 研究所内 Nara (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/015138

(74) 代理人: 日比 紀彦, 外(HIBI, Norihiko et al.): 〒542-
0086 大阪府 大阪市 中央区西心斎橋 1 丁目 13 番
18号 イナバビル 3 階 キシモト特許事務所内 Osaka
(JP).

(22) 国際出願日: 2003年11月27日 (27.11.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2002-343645
2002年11月27日 (27.11.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 参天
製薬株式会社 (SANTEN PHARMACEUTICAL CO.,
LTD.) [JP/JP]: 〒533-8651 大阪府 大阪市 東淀川区 下
新庄 3 丁目 9 番 19号 Osaka (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KH, LS,
MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特
許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッ
パ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 樋崎 寛子
(HIZAKI, Hiroko) [JP/JP]: 〒630-0101 奈良県 生駒市
高山町8916-16 参天製薬株式会社 研究所内 Nara (JP).
石田 成弘 (ISHIDA, Naruhiro) [JP/JP]: 〒630-0101 奈
良県 生駒市 高山町8916-16 参天製薬株式会社 研究
所内 Nara (JP). 松木 雄 (MATSUOKA, Takeshi) [JP/JP]: 〒
630-0101 奈良県 生駒市 高山町8916-16 参天製薬株
式会社 研究所内 Nara (JP). 原 英彰 (HARA, Hideaki)

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: REMEDY FOR GLAUCOMA CONTAINING LIM KINASE INHIBITORY COMPOUND AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 発明の名称: LIMキナーゼ阻害作用を有する化合物を有効成分とする緑内障治療剤

(57) Abstract: It is intended to find out a remedy for glaucoma having a novel function mechanism. A compound having an LIM kinase inhibitory effect promotes actin depolymerization in trabecular cells and lowers ocular tension. Thus, the compound having an LIM kinase inhibitory effect is highly useful as a remedy for glaucoma.

(57) 要約: 本発明は、新たな作用機序を有する緑内障治療剤を見いだすことを課題とする。LIMキナーゼ阻害作用を有する化合物は、緑内障細胞のアクチン脱重合を促進し、眼圧を下降させる。したがって、LIMキナーゼ阻害作用を有する化合物は緑内障治療剤として非常に有用である。

明 細 書

LIMキナーゼ阻害作用を有する化合物を有効成分とする
緑内障治療剤

5

技術分野

本発明は LIM キナーゼ阻害作用を有する化合物またはその塩を有効成分とする緑内障治療剤に関するものである。

10 背景技術

緑内障は、種々の病因により眼圧が上昇し、眼球の内部組織（網膜、視神経等）が障害を受けることで失明に至る危険性のある難治性の眼疾患である。緑内障の治療方法としては、眼圧下降療法が一般的であり、その代表的なものとして薬物療法、レーザー治療、手術療法等がある。

15

薬物療法には、交感神経刺激薬（エピネフリン等の非選択性刺激薬、アブラクロニジン等の α_2 刺激薬）、交感神経遮断薬（チモロール、ベプノロール、カルテオロール、ベタキソール等の β 遮断薬、塩酸ブナゾシン等の α_1 遮断薬、ニブラジロール等の $\alpha\beta$ 遮断薬）、副交感神経作動薬（ピロカルピン等）、炭酸脱水酵素阻害薬（アセタゾラミド等）、プロスタグランジン類（イソプロピルウノプロストン、ラタノプロスト、トラボプロスト、ビマトプロスト等）などの薬物が使用されているが、より有用な化合物の開発に向けての研究開発が続けられている。

20

LIM キナーゼは、N末端側に二つの LIM ドメインと一つの PDZ ドメインを、C末端側にプロテインキナーゼドメインを有するセリン/スレオニンキナーゼである。LIM キナーゼとしては、LIMK1、LIMK2 等のサブタイプが知られており、Rac-PAK 経路、Rho-ROCK 経路、Cdc42-MRCK 経路等

25

の活性化に伴い、これらの LIM キナーゼが活性化され、アクチン脱重合因子であるコフィリンのリン酸化を介して、細胞の形態を支配するアクチン細胞骨格の再構築を制御していると考えられている。また、この LIM キナーゼは、遺伝病であるウィリアムス症候群の発症や癌細胞の浸潤、
5 転移等に深く関与していると考えられている（実験医学 Vol. 17、No. 14（増刊）、1774～1780頁（1999年）および第60回日本癌学会総会記事、演題番号395、164頁（2001年）参照）。

ところで、IOVS., 42, 1029-1037(2001)には LIM キナーゼが培養ヒト線維柱帯細胞に存在することが開示されており、また Mol. Cell.
10 Biol., 22, 774-783(2002)には、コフィリンのアミノ酸配列に基づき新に設計された LIM キナーゼ阻害剤として、Met-Ala-Ser-Gly-Val-Ala-Val-Ser-Asp-Gly-Val-Ile-Lys-Val-Phe-Asn-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys が開示されている。しかし、その具体的な疾患に対する用途は全く開示されていない。

15 また、欧州特許第 322738 号明細書、Ber., 44, 3502-3505 (1912)、Molecular Pharmacology 45(4), 673-683(1994)、J. Pharm. Soc. Japan, 76, 1448-1449 (1956) および Pharmaceutical Research, 16(1), 117-122 (1999)には、LIM キナーゼ阻害作用を有すると予測される化合物、すなわち、2-(3,4-ジヒドロキシベンジリデン)マロノニトリル [AG 18]、2-シアノー-3-(3,4-ジヒドロキシフェニル)チ
20 オアクリルアミド [AG 213]、3-(3,4-ジヒドロキシフェニル)-1-(2,4-ジヒドロキシフェニル)プロペノン [Butein]、2-シアノー-N-(3-(2-シアノー-3-(3,4-ジヒドロキシフェニル)-アクリロイルアミノ)プロピル)-3-(3,4-ジヒドロキシフェ
25 ニル)アクリルアミド [AG 537]、3-ヒドロキシ-1-メトキシ-9,10-ジオキソ-9,10-ジヒドロアントラセン-2-カルボアルデヒド [Damnacanthal]、3-(6,7-ジメトキシキナゾリン-4-イル

アミノ)フェノール(WHI-P 180)等の化合物が記載されている。

一方、IOVS., 41, 619-623 (2000)および IOVS., 16, 47-53 (1977)には、線維柱帯細胞のアクチン脱重合を促進させることができれば、線維柱帯流出経路からの房水流出が促進されて、眼圧が下降することが示唆されている。

しかしながら、いずれの文献にも、LIM キナーゼ阻害作用と眼疾患の関係、また、LIM キナーゼ阻害作用を有する化合物の眼科用途、線維柱帯細胞に対する作用、緑内障の治療効果等に関する記載は一切なされていない。

10

発明の開示

既に数多くの緑内障治療剤が医療の現場で使用されている。しかし、緑内障は種々の病因により発症する疾病である為、新たな作用機序を有する緑内障治療剤の研究開発が望まれている。

15 本発明者らは、新たな作用機序を有する緑内障治療剤を見出す為に鋭意研究を重ねた結果、LIM キナーゼ阻害作用を有する化合物が、線維柱帯細胞のアクチン脱重合を促進し、眼圧を下降させることを見出し、本発明を完成させた。

本発明は眼圧上昇を伴う眼疾患の治療やそれらの予防に好適に用いることができる。

20

LIM キナーゼ阻害作用を有する化合物は、線維柱帯細胞におけるアクチン脱重合を促進し、眼圧下降作用を示す。したがって、LIM キナーゼ阻害作用を有する化合物は緑内障治療剤として非常に有用である。

25 本発明は LIM キナーゼ阻害作用を有する化合物またはその塩を有効成分とする緑内障治療剤に関するものである。

本発明における LIM キナーゼ阻害作用を有する化合物とは、LIM キナ

ーゼの活性を阻害する化合物またはコフィリンのリン酸化を抑制する化合物を意味する。例えば、LIMK1 または LIMK2 の活性を阻害する化合物が挙げられ、具体的には、Mol. Cell. Biol., 22, 774-783(2002)に記載の Met-Ala-Ser-Gly-Val-Ala-Val-Ser-Asp-Gly-Val-Ile-Lys-Val-Phe-Asn-
5 Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys [S3 Peptide、化合物 1]、欧州特許第 322738 号明細書に記載の 2-(3, 4-ジヒドロキシベンジリデン) マロノニトリル [AG 18、化合物 2] および 2-シアノ-3-(3, 4-ジヒドロキシフェニル) チオアクリルアミド [AG 213、化合物 3]、Ber., 44, 3502-3505(1912)に記載の 3-(3, 4-ジヒドロキシフェニル)-1-(2, 4-ジヒドロキシフェニル) プロペノン [Butein、化合物 4]、Molecular Pharmacology 45(4), 673-683(1994)に記載の 2-シアノ-N-(3-(2-シアノ-3-(3, 4-ジヒドロキシフェニル)-アクリロイルアミノ)プロピル)-3-(3, 4-ジヒドロキシフェニル)アクリルアミド [AG 537、化合物 5]、J. Pharm. Soc. Japan, 76, 1448-1449(1956)に記載の 3-ヒドロキシ-1-メトキシ-9, 10-ジオキソ-9, 10-ジヒドロアントラセン-2-カルボアルデヒド [Damnacanthal、化合物 6]、並びに Pharmaceutical Research, 16(1), 117-122(1999)に記載の 3-(6, 7-ジメトキシキナゾリン-4-イルアミノ)フェノール [WHI-P180、化合物 7] 等の化合物、好ましくは、Met-Ala-Ser-Gly-Val-Ala-Val-Ser-
10 Asp-Gly-Val-Ile-Lys-Val-Phe-Asn-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys、2-シアノ-N-(3-(2-シアノ-3-(3, 4-ジヒドロキシフェニル)-アクリロイルアミノ)プロピル)-3-(3, 4-ジヒドロキシフェニル)アクリルアミドおよび 3-ヒドロキシ-1-メトキシ-9, 10-ジオキソ-9, 10-ジヒドロアントラセン-2-カルボアルデヒドが例示される。
25

本発明における LIM キナーゼ阻害作用を有する化合物は、塩の形態を

とっていてもよい。例えば、塩酸、硝酸等の無機酸との塩やシュウ酸、コハク酸、酢酸等の有機酸との塩、また、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属との塩やカルシウム等のアルカリ土類金属との塩を挙げることができる。

- 5 さらに、本発明における LIM キナーゼ阻害作用を有する化合物は、水和物または溶媒和物の形態をとっていてもよい。

本発明における緑内障とは、原発性開放隅角緑内障、正常眼圧緑内障、房水産生過多緑内障、高眼圧症、急性閉塞隅角緑内障、慢性閉塞隅角緑内障、混合型緑内障、ステロイド緑内障、アミロイド緑内障、血管新生
10 緑内障、悪性緑内障、水晶体の嚢性緑内障、台地状虹彩シンドローム (plateau iris syndrome) 等を含む。

後述の薬理試験の項で詳細に説明するが、本発明者等は、LIM キナーゼを阻害すれば、コフィリンのリン酸化が抑制されて、線維柱帯細胞のアクチン脱重合が促進され、それに引き続き線維柱帯流出経路からの房
15 水流出が増大して、眼圧が下降するとの仮説に基づき、以下の試験を行った。まず、ブタ線維柱帯組織における LIM キナーゼの発現の有無を検討し、次いで、LIM キナーゼ阻害作用を有する化合物が、培養ブタ線維柱帯細胞におけるアクチン脱重合を促進するか否かについて検討した。その結果、ブタ線維柱帯組織に LIM キナーゼが発現していること、また、
20 LIM キナーゼ阻害作用を有する化合物が培養ブタ線維柱帯細胞においてアクチン脱重合を促進させることを見出した。また、欧州特許第 322738 号明細書、Ber., 44, 3502-3505 (1912)、Molecular Pharmacology 45(4), 673-683(1994)、J. Pharm. Soc. Japan, 76, 1448-1449 (1956) および Pharmaceutical Research, 16(1), 117-122 (1999) に記載された化合物、すなわち、2 - (3, 4 - ジヒドロキシベンジリデン) マロノニトリル [AG 18]、2 - シアノ - 3 - (3, 4 - ジヒドロキシフェニル) チオアクリルアミド [AG 213]、3 - (3, 4 - ジヒドロキシフェニル) -
25

1 - (2, 4 - ジヒドロキシフェニル) プロペノン [Butein]、2 - シア
ノ - N - (3 - (2 - シアノ - 3 - (3, 4 - ジヒドロキシフェニル)
- アクリロイルアミノ) プロピル) - 3 - (3, 4 - ジヒドロキシフェ
ニル) アクリルアミド [AG 537]、3 - ヒドロキシ - 1 - メトキシ - 9,
5 10 - ジオキソ - 9, 10 - ジヒドロアントラセン - 2 - カルボアルデ
ヒド [Damnacanthol]、3 - (6, 7 - ジメトキシキナゾリン - 4 - イル
アミノ) フェノール [WHI-P 180] が LIM キナーゼ阻害作用を有すること
を確認した。さらに、LIM キナーゼ阻害作用を有する化合物が、実際に
眼圧を下降させるか否かを確認する為に、LIM キナーゼ阻害作用を有す
10 る化合物を日本白色ウサギの前房内に投与し、眼圧の変化について検討
した。その結果、LIM キナーゼ阻害作用を有する化合物が日本白色ウサ
ギの眼圧を顕著に下降させることを見出し、本発明を完成させた。

本発明は、LIM キナーゼ阻害作用を有する化合物が、眼圧下降作用を
示すことを見出し、その作用機序を明らかとした点に特徴があり、LIM
15 キナーゼ阻害作用を有する化合物の化学構造に制約されるものではない。
また、眼圧下降効果の強弱も本発明の有用性に影響を与えるものではな
い。

LIM キナーゼ阻害作用を有する化合物は、経口でも、非経口でも投与
することができ、その投与剤型としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、
20 散剤、点眼剤、眼軟膏、注射剤等が挙げられ、特に点眼剤、注射剤が好
ましい。

これらは汎用されている技術を用いて製剤化することができ、例えば
点眼剤は、塩化ナトリウム、濃グリセリン等の等張化剤、リン酸ナトリ
ウム、酢酸ナトリウム等の緩衝剤、ポリオキシエチレンモノオレート、
25 ステアリン酸ポリオキシシル 40、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油等の
界面活性剤、クエン酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム等の安定化剤、
塩化ベンザルコニウム、パラベン等の防腐剤などを必要に応じて使用し

て、調製することができる。

pHは眼科製剤に許容される範囲であればよく、pH 4～8の範囲が好ましい。

投与量は、年齢、症状等により適宜選択できるが、点眼剤の場合には、
5 0.0001～10% (w/v)、好ましくは、0.001～1% (w/v) のものを1日1回または数回に分けて点眼することができる。

また、本発明に係る LIM キナーゼ阻害作用を有する化合物は、他の緑内障治療剤と併用することもできる。

10 図面の簡単な説明

図1は、ブタ線維柱帯組織における LIMK1 の発現を示す図である。尚、レーン1は分子量マーカーの泳動図であり、その左の数値は、分子量マーカーの泳動位置を示す。

図2は、ブタ線維柱帯組織における LIMK2 の発現を示す図である。
15 尚、レーン1は分子量マーカーの泳動図であり、その左の数値は、分子量マーカーの泳動位置を示す。

図3は、培養ブタ線維柱帯細胞を LIM キナーゼ阻害剤で処理した時のアクチンストレスファイバーの形成度合いを示す蛍光顕微鏡像写真である。アクチンストレスファイバーの形成はほとんど確認できない。

20 図4は、培養ブタ線維柱帯細胞を LIM キナーゼ阻害剤で処理しない時（コントロール）のアクチンストレスファイバーの形成度合いを示す蛍光顕微鏡像写真である。アクチンストレスファイバーの形成が確認できる。

図5は、LIM キナーゼ阻害剤として、化合物1を使用した時の各投与
25 群の眼圧の経時変化を示すグラフである。眼圧は初期眼圧からの変化値で示す。■は LIM キナーゼ阻害剤投与群、○はコントロール群を示す。

図6は、LIM キナーゼ阻害剤として、化合物5を使用した時の各投与

群の眼圧の経時変化を示すグラフである。眼圧は初期眼圧からの変化値で示す。■は LIM キナーゼ阻害剤投与群、○はコントロール群を示す。

図 7 は、LIM キナーゼ阻害剤として、化合物 6 を使用した時の各投与群の眼圧の経時変化を示すグラフである。眼圧は初期眼圧からの変化値で示す。■は LIM キナーゼ阻害剤投与群、○はコントロール群を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下に製剤例および薬理試験の結果を示すが、これらの実施例は、本発明をよりよく理解するためのものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

[製剤例]

本発明における LIM キナーゼ阻害作用を有する化合物として
Met-Ala-Ser-Gly-Val-Ala-Val-Ser-Asp-Gly-Val-Ile-Lys-Val-Phe-Asn-
Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys
(化合物 1) を用いた点眼剤の一般的な製剤例を以下に示す。

点眼剤 (100 mL 中)

化合物 1 10 mg

生理食塩水 適量

[薬理試験]

1. 線維柱帯における LIM キナーゼ (LIMK1 および LIMK2) 発現確認試験

ブタ線維柱帯組織を使用して、線維柱帯組織における LIM キナーゼの発現の有無を検討した。

1) 試験方法

(1) ブタ眼 (10 眼) より摘出した線維柱帯組織にレムリサンプルバ

ッファーを加えた後、同組織をホモジナイズし、線維柱帯組織のホモジネートを作成した。

(2) Nature, 227, 680-685 (1970)に記載の Laemmli の方法に準じて、10%ポリアクリルアミドゲルを使用し、線維柱帯組織のホモジネートを SDS-PAGE により分画した。

(3) SDS-PAGE により分画された線維柱帯組織のホモジネートを PVDF 膜 (ポリビニリデンジフルオリド膜) に転写し、抗 LIMK1 抗体を使用してウェスタンブロッティングを行い、LIMK1 の発現を確認した。

(4) 抗 LIMK1 抗体を抗 LIMK2 抗体に代え、他は上記 (1) ~ (3) と同じ方法で試験し、LIMK2 の発現を確認した。

2) 結果および考察

図 1 にブタ線維柱帯組織における LIMK1 発現確認試験の結果を、図 2 にブタ線維柱帯組織における LIMK2 発現確認試験の結果をそれぞれ示す。

LIMK1 および LIMK2 の分子量は約 70 kDa であることが、J.Biol. Chem., 270, 31321-31330 (1995) および Oncogene, 11, 701-710 (1995) に開示されている。図 1 および図 2 には、分子量が約 70 kDa 付近に抗原抗体反応によるバンド (矢印で示すもの) が観察された。したがって、ブタ線維柱帯組織において、LIM キナーゼ (LIMK1 および LIMK2) が発現していることが確認された。

2. LIM キナーゼ阻害作用を有する化合物 (以下、LIM キナーゼ阻害剤とする) による線維柱帯細胞のアクチン脱重合確認試験

LIM キナーゼ阻害剤の線維柱帯に対する作用を確認するために、培養ブタ線維柱帯細胞を LIM キナーゼ阻害剤で処理した時の培養ブタ線維柱帯細胞のアクチン脱重合作用を検討した。尚、LIM キナーゼ阻害剤としては、Met-Ala-Ser-Gly-Val-Ala-Val-Ser-Asp-Gly-Val-Ile-Lys-Val-

Phe-Asn-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys (化合物 1) を使用した。

1) LIM キナーゼ阻害剤溶液の調製

LIM キナーゼ阻害剤をリン酸緩衝液に溶解して、濃度が 2×10^{-6} M の

5 LIM キナーゼ阻害剤溶液を調製した。

2) 試験方法

(1) ブタ線維柱帯組織より得た初代培養ブタ線維柱帯細胞を Ham' s F-10 培地に懸濁させて、 3×10^4 cell/cm² となるようコラーゲンタイプ 1 コートチャンバースライドに播種し、5% 二酸化炭素雰囲気下、37℃ で約 1 日培養した。

(2) Chariot (登録商標) Kit を用いて、LIM キナーゼ阻害剤濃度が 2×10^{-6} M となるように LIM キナーゼ阻害剤溶液および Ham' s F-10 培地を培養ブタ線維柱帯細胞に添加し、先と同様の条件で培養を継続した。

15 (3) LIM キナーゼ阻害剤溶液の添加 1 時間後に最終濃度が LIM キナーゼ阻害剤 1×10^{-6} M、リゾフォスファチジン酸 10 μ M となるようにリゾフォスファチジン酸含有 Ham' s F-10 を累積添加し、先と同様の条件で培養を継続した。

20 (4) リゾフォスファチジン酸の添加 1 時間後に培養を終了し、培養ブタ線維柱帯細胞を IOVS, 42, 1029-1037 (2001) に記載の Rao 等の方法に準じて、F-アクチン染色を行った後、蛍光顕微鏡像を写真撮影した。

(5) LIM キナーゼ阻害剤溶液をリン酸緩衝液 (最終濃度 0.5%) に代え、他は上記 (1) ~ (4) と同じ方法で試験したものをコントロールとした。

25 尚、アクチン脱重合が促進するか否かは、アクチン重合が促進すると観察されるアクチンストレスファイバーの形成度合いを基準に判断した。

3) 結果および考察

図 3 には、LIM キナーゼ阻害剤で処理した培養ブタ線維柱帯細胞のアクチンストレスファイバー染色像を、図 4 には、コントロール時の培養ブタ線維柱帯細胞のアクチンストレスファイバー染色像を試験結果として示す。

- 5 図 3 より、LIM キナーゼ阻害剤で処理した培養ブタ線維柱帯細胞には、アクチンストレスファイバーの形成はほとんどみられず、コントロール時の培養ブタ線維柱帯細胞にはアクチンストレスファイバーの顕著な形成が観察された。

このことから、LIM キナーゼを阻害することで、培養ブタ線維柱帯細胞において、アクチン脱重合が促進されていることが確認された。

3. LIM キナーゼ阻害作用確認試験

欧州特許第 322738 号明細書に記載の 2-(3,4-ジヒドロキシベンジリデン)マロノニトリル [AG 18、化合物 2] および 2-シアノ-3-(3,4-ジヒドロキシフェニル)チオアクリルアミド [AG 213、化合物 3]、Ber., 44, 3502-3505(1912)に記載の 3-(3,4-ジヒドロキシフェニル)-1-(2,4-ジヒドロキシフェニル)プロペノン [Butlein、化合物 4]、Molecular Pharmacology 45(4), 673-683(1994)に記載の 2-シアノ-N-(3-(2-シアノ-3-(3,4-ジヒドロキシフェニル)-アクリロイルアミノ)プロピル)-3-(3,4-ジヒドロキシフェニル)アクリルアミド [AG 537、化合物 5]、J. Pharm. Soc. Japan, 76, 1448-1449(1956)に記載の 3-ヒドロキシ-1-メトキシ-9,10-ジオキソ-9,10-ジヒドロアントラセン-2-カルボアルデヒド [Damnacanthal、化合物 6]、並びに Pharmaceutical Research, 16(1), 117-122(1999)に記載の 3-(6,7-ジメトキシキナゾリン-4-イルアミノ)フェノール [WHI-P 180、化合物 7] の LIM キナーゼ阻害作用を検討した。

1) 被験化合物溶液の調製

上記の各化合物を1～100 μ Mとなるように1%ジメチルスルホキシド含有トリスバッファーに溶解し、被験化合物溶液を調製した。

2) 試験方法

(1) 50 mM トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、1 mM エチレングリコールビス (2-アミノエチルエーテル) 四酢酸、0.3% ポリオキシエチレン (23) ラウリルエーテル、0.1% 2-メルカプトエタノール、15 mM 塩化マグネシウム、100 μ M アデノシン三リン酸、5 mM β -グリセロールリン酸、0.2 mM オルトパナジン酸 (V) ナトリウム、12 ng LIMK1 (Upstate Biotechnology, #14-457)、1 μ g コフィリン2 (Upstate Biotechnology, #12-454) および被験化合物溶液を含む反応液 (50 μ L) を30℃、10分間反応させた。反応はレムリサンプルバッファーを50 μ L 添加することにより終了させ、4℃で静置した。

(2) Nature, 227, 680-685 (1970) に記載の Laemmli の方法に準じて、12.5% ポリアクリルアミドゲルを使用し、反応生成物を SDS-PAGE により分画した。

(3) SDS-PAGE により分画された反応生成物を PVDF 膜 (ポリビニリデンジフルオリド膜) に転写し、抗リン酸化コフィリン抗体を使用してウェスタンブロッティングを行い、高感度ケミルミネッセンス法 (ECL 法) によりリン酸化コフィリンのバンドを検出した。

(4) リン酸化コフィリン量のバンド濃度をデンシトメーターで定量化した。

(5) 被験化合物の阻害作用 (LIM キナーゼ活性阻害率) は被験化合物非添加時 (コントロール) のバンド濃度との比較により次式に従って算出した。

LIM キナーゼ活性阻害率 (%)

$$= 100 - (\text{被験化合物添加時のバンド濃度}) / (\text{コントロール時のバ$$

ンド濃度) $\times 100$

3) 結果および考察

化合物 2 ~ 7 のいずれの化合物も $1 \sim 100 \mu\text{M}$ の範囲で、LIM キナーゼ阻害作用を有することが確認された。

4. 眼圧下降効果試験

日本白色ウサギの前房内に LIM キナーゼ阻害作用を有する化合物（以下、LIM キナーゼ阻害剤とする）を投与することで、LIM キナーゼ阻害剤の眼圧下降効果を検討した。LIM キナーゼ阻害剤としては、化合物 1、化合物 5 および化合物 6 を使用した。

1) LIM キナーゼ阻害剤溶液の調製

LIM キナーゼ阻害剤を基剤に溶解して pH を中性付近に調整し、下記表 1 に示す所望の濃度の LIM キナーゼ阻害剤溶液を調製した。

表 1

LIM キナーゼ阻害剤	基剤	濃度 (M)
化合物 1	生理食塩水	1×10^{-6}
化合物 5	ジメチルスルホキシド含有生理食塩水	1×10^{-4}
化合物 6	ジメチルスルホキシド含有生理食塩水	1×10^{-4}

2) 投与および測定方法

(1) LIM キナーゼ阻害剤溶液の投与直前に 0.4% 塩酸オキシブプロカイン点眼液（商品名：ベノキシール 0.4% 液）をウサギの両眼に一滴ずつ点眼して局所麻酔し、眼圧を測定した。また、この眼圧を初期眼

圧とした。

(2) LIM キナーゼ阻害剤溶液 (20 μ l) をウサギの片眼に前房内投与した (対側眼は無処置)。

(3) LIM キナーゼ阻害剤溶液の前房内投与の2時間および4時間後に
5 0.4% 塩酸オキシプロカイン点眼液 (商品名: ペノキシル 0.4% 液) をウサギの両眼に一滴ずつ点眼して局所麻酔し、眼圧を測定した。

(4) LIM キナーゼ阻害剤溶液を基剤のみに代え、他は上記(1)～(3)と同じ方法で試験をした。これをコントロールとした。

尚、眼圧は各3回測定し、その平均値を結果とした。また実験動物は、
10 日本白色ウサギ (系統: JW、性別: 雄性) を使用し、LIM キナーゼ阻害剤溶液投与群においては、一群5匹を、コントロール群においては、一群5あるいは6匹を使用した。

3) 結果と考察

図5に化合物1の、図6に化合物5の、図7に化合物6の眼圧下降効果試験の結果を示す。眼圧は初期眼圧からの変化値を示す。以上の結果
15 から LIM キナーゼ阻害剤が、眼圧を下降させることが明らかとなった。

以上、薬理試験1.～4.の結果および背景技術より、LIM キナーゼを阻害すると、コフィリンのリン酸化が抑制されて、線維柱帯細胞のアクチン脱重合が促進され、線維柱帯流出経路からの房水流出が増加し、
20 眼圧が下降することが理論的に明らかとなった。

産業上の利用可能性

—本発明により、LIMキナーゼ阻害作用を有する化合物またはその塩を有効成分とする緑内障治療剤が提供される。

請求の範囲

1. LIM キナーゼ阻害作用を有する化合物またはその塩を有効成分とする緑内障治療剤。

5 2. LIM キナーゼ阻害作用を有する化合物が Met-Ala-Ser-Gly-Val-Ala-Val-Ser-Asp-Gly-Val-Ile-Lys-Val-Phe-Asn-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys のアミノ酸配列で表されるペプチド、2-シアノ-N-(3-(2-シアノ-3-(3,4-ジヒドロキシフェニル)-アクリロイルアミノ)プロピル)-3-(3,4-ジヒドロキシフェニル)アクリルアミドおよび3-ヒドロキシ-1-メトキシ-9,10-ジオキソ-9,10-ジヒドロアントラセン-2-カルボアルデヒドからなる群より選択される化合物またはそれらの塩である請求項1記載の緑内障治療剤。

10

3. LIM キナーゼ阻害作用を有する化合物またはその塩を患者に有効量投与することからなる緑内障の治療方法。

15

4. LIM キナーゼ阻害作用を有する化合物が Met-Ala-Ser-Gly-Val-Ala-Val-Ser-Asp-Gly-Val-Ile-Lys-Val-Phe-Asn-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys のアミノ酸配列で表されるペプチド、2-シアノ-N-(3-(2-シアノ-3-(3,4-ジヒドロキシフェニル)-アクリロイルアミノ)プロピル)-3-(3,4-ジヒドロキシフェニル)アクリルアミドおよび3-ヒドロキシ-1-メトキシ-9,10-ジオキソ-9,10-ジヒドロアントラセン-2-カルボアルデヒドからなる群より選択される化合物またはそれらの塩である請求項3記載の緑内障の治療方法。

20

5. 緑内障治療剤を製造するための LIM キナーゼ阻害作用を有する化合物またはその塩の使用。

25

6. LIM キナーゼ阻害作用を有する化合物が Met-Ala-Ser

-Gly-Val-Ala-Val-Ser-Asp-Gly-Val-Ile-Lys-Val-Phe-Asn-Arg-Gln-Ile
-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys のアミノ酸
配列で表されるペプチド、2-シアノ-N-(3-(2-シアノ-3-(
(3, 4-ジヒドロキシフェニル)-アクリロイルアミノ)プロピル)
5 -3-(3, 4-ジヒドロキシフェニル)アクリルアミドおよび3-ヒ
ドロキシ-1-メトキシ-9, 10-ジオキソ-9, 10-ジヒドロア
ントラセン-2-カルボアルデヒドからなる群より選択される化合物ま
たはそれらの塩である請求項5記載の使用。

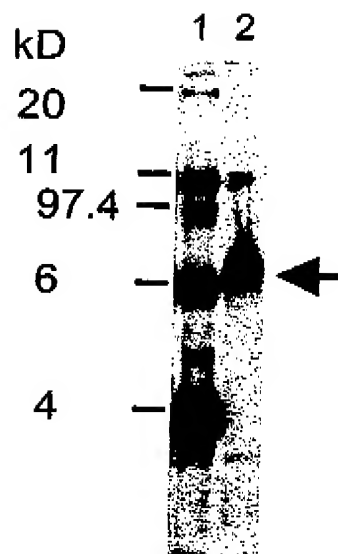
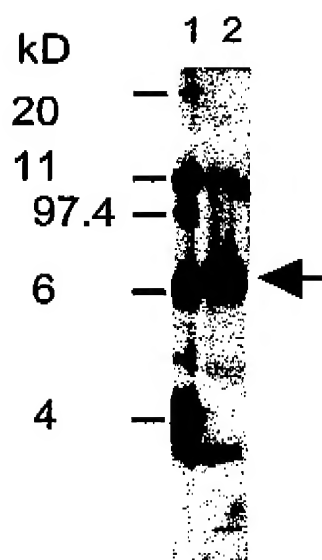
**Fig.1****Fig.2**



Fig.3



Fig.4

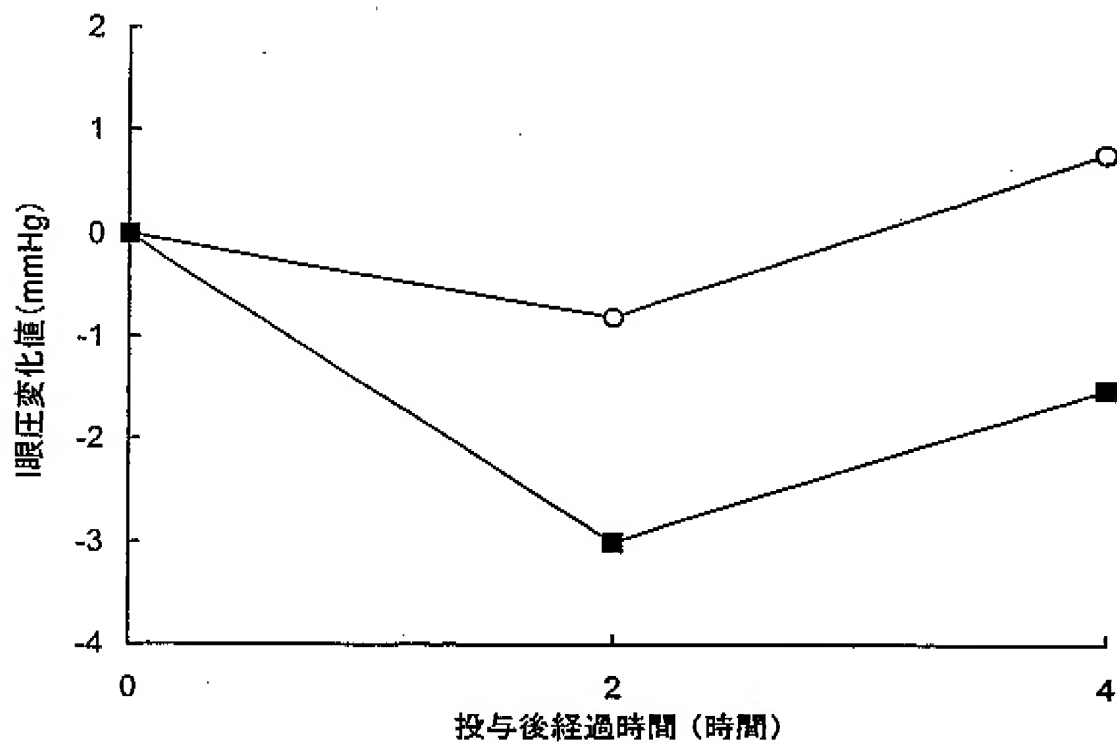


Fig.5

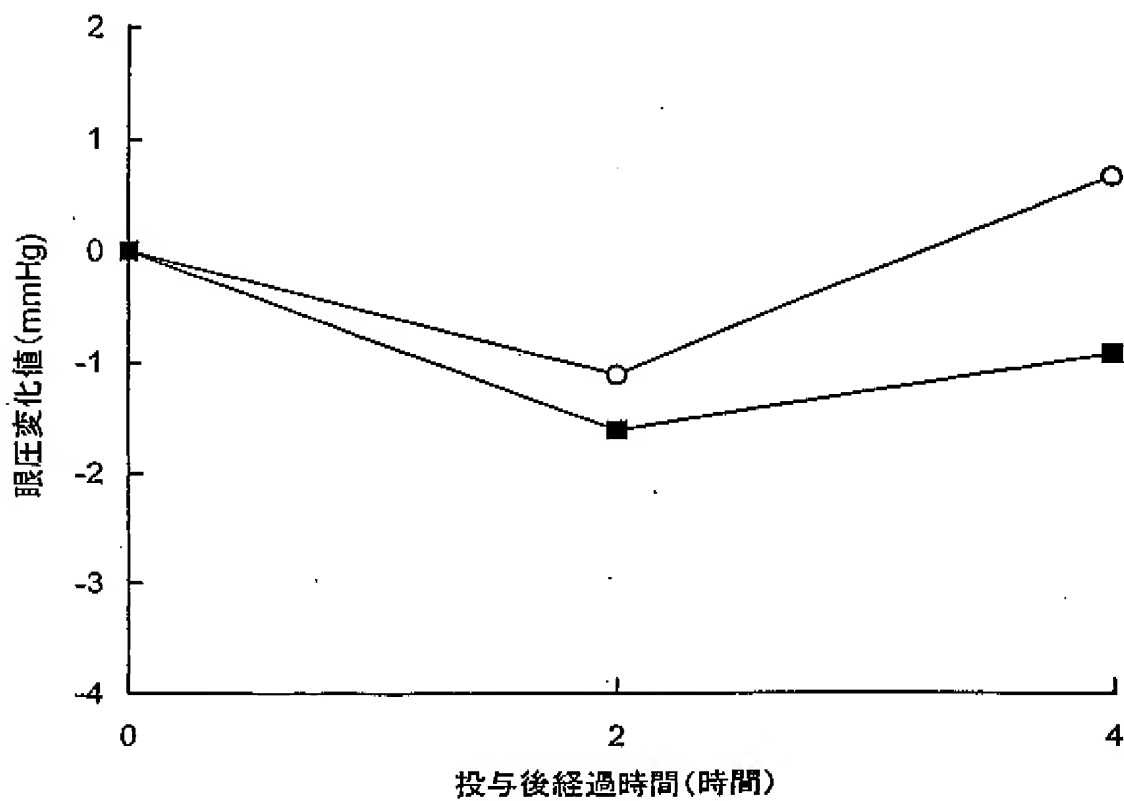
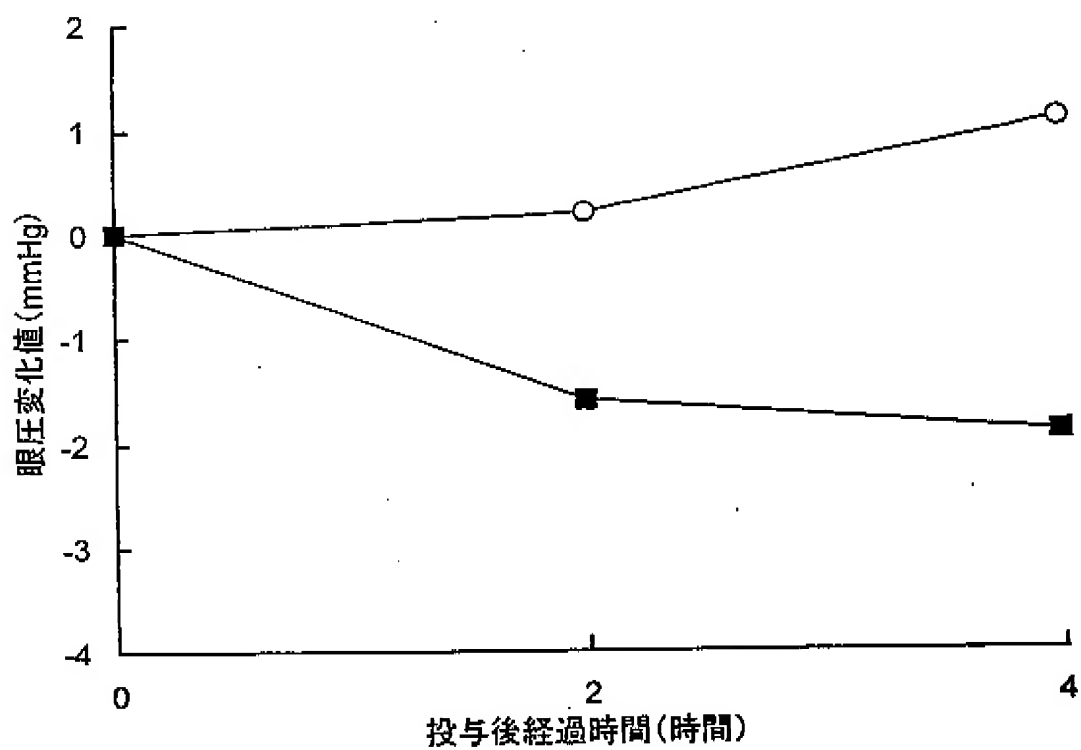


Fig.6

**Fig.7**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15138

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K45/00, 38/00, 31/165, 31/122, A61P27/06, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K45/00, 38/00, 31/165, 31/122, A61P27/06, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE, CAPLUS, EMBASE, BIOSIS (STN), JSTPLUS (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Tian B. et al., 'Cytoskeletal involvement in the regulation of aqueous humor outflow.', Invest Ophthalmol Vis.Sci., 41(3), 2000, 619-23	1,2,5,6
Y	Nishita M. et al., 'Stromal cell-derived factor lalpha activates LIM kinase 1 and induces cofilin phosphorylation for T-cell chemotaxis.', Mol.Cell. Biol., 22(3), 2000 February, 774-83	1,2,5,6
A	Rao PV et al., 'Modulation of aqueous humor outflow facility by the Rho kinase-specific inhibitor Y-27632.', Invest Ophthalmol Vis. Sci., 42(5), 2001, 1029-37	1,2,5,6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
05 February, 2004 (05.02.04)

Date of mailing of the international search report
17 February, 2004 (17.02.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15138

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Posner I et al., 'Kinetics of inhibition by tyrphostins of the tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor receptor and analysis by a new computer program.', Mol. Pharmacol., 45(4), 1994, 673-83	1,2,5,6
A	Hiwasa T. et al., 'Stimulation of ultraviolet -induced apoptosis of human fibroblast UVR-1 cells by tyrosine kinase inhibitors.', FEBS Lett., 444(2-3), 1999, 173-6	1,2,5,6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/15138

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 3, 4
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 3 and 4 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15138

<Subject of search>

Claims 1 and 5 relate to a remedy for glaucoma containing, as the active ingredient, a compound defined by a desired property "LIM kinase inhibitory effect". Although claims 1 and 5 involve any compounds having the above property, only part of the claimed compounds are disclosed in the meaning within PCT Article 5. Thus, it appears that these claims are not supported by the disclosure in the description in the meaning within PCT Article 6.

Although the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, the scope of "compound having an LIM kinase inhibitory effect" cannot be specified. Thus, claims 1 to 5 do not comply with the requirement of clearness in the meaning within PCT Article 6 too.

Such being the case, the search was made on the relation between LIM kinase and glaucoma and remedies for glaucoma containing the compounds specifically cited in the description and specified in claims 2 and 6 as the active ingredient. Complete search was made on claims 2 and 6.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K45/00, 38/00, 31/165, 31/122, A61P27/06, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K45/00, 38/00, 31/165, 31/122, A61P27/06, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE CAPLUS EMBASE BIOSIS (STM) JSTPLUS (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Tian B et al., 'Cytoskeletal involvement in the regulation of aqueous humor outflow.', Invest Ophthalmol Vis Sci., 41(3), 2000, 619-23	1, 2, 5, 6
Y	Nishita M et al., 'Stromal cell-derived factor 1alpha activates LIM kinase 1 and induces cofilin phosphorylation for T-cell chemotaxis.', Mol Cell Biol, 22(3), 2000. 02, 774-83	1, 2, 5, 6
A	Rao PV et al., 'Modulation of aqueous humor outflow facility by the Rho kinase-specific inhibitor Y-27632.', Invest Ophthalmol Vis Sci., 42(5), 2001, 1029-37	1, 2, 5, 6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05.02.2004

国際調査報告の発送日

17.2.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

川口 裕美子

印

4C

9829

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Posner I et al., 'Kinetics of inhibition by tyrphostins of the tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor receptor and analysis by a new computer program.', Mol Pharmacol., 45(4), 1994, 673-83	1, 2, 5, 6
A	Hiwasa T et al., 'Stimulation of ultraviolet-induced apoptosis of human fibroblast UVr-1 cells by tyrosine kinase inhibitors.', FEBS Lett., 444(2-3), 1999, 173-6	1, 2, 5, 6

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 3, 4 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲 3, 4 は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i) 及びPCT規則39.1(iv) の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

<調査の対象について>

請求の範囲1, 5は、「LIMキナーゼ阻害作用」という所望の性質により定義された化合物を有効成分とする緑内障治療剤に関するものである。そして、請求の範囲1, 5は、そのような性質を有するあらゆる化合物を包含するものであるが、PCT第5条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分にすぎず、PCT第6条の意味での明細書の開示による裏付けを欠くものと認められる。

また、「LIMキナーゼ阻害作用を有する化合物」は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、請求の範囲1, 5は、PCT第6条における明確性の要件も欠いている。

よって、調査は、LIMキナーゼと緑内障との関係について、及び、明細書に具体的に記載され、請求の範囲2, 6に特定されている化合物を有効成分とする緑内障治療剤について行った。また、請求の範囲2, 6については、完全な調査を行った。

